

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ТЕМОПОРФИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕЖДУ НАНОРАЗМЕРНЫМ НОСИТЕЛЕМ МЕТИЛ- β -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ И СЫВОРОТОЧНЫМИ БЕЛКАМИ

И. В. Яковец^{1,2,3}, И. В. Янковский¹, И. И. Хлудеев^{1,4},
Н.-П. Lassalle^{2,3}, Л. Н. Бездетная^{2,3}, В. П. Зорин^{1,5*}

УДК 577.3;615.011

¹ Белорусский государственный университет,

220030, Минск, просп. Независимости, 4, Беларусь; e-mail: vpzorin@mail.ru

² Университет Лотарингии, Вандувре-ле-Нанси, Франция

³ Институт канцерологии Лотарингии, 54519 Вандувре-ле-Нанси, Франция

⁴ Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники, Минск, Беларусь

⁵ Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

(Поступила 18 июля 2017)

Рассмотрены различные оптические методические подходы к анализу процессов распределения фотосенсибилизатора темопорфина между супрамолекулярными наноразмерными комплексами включения с β -циклодекстринами и белками сыворотки крови. Проведено сравнение возможностей оптических методов на основе индуцированного кругового дихроизма, анизотропии флуоресценции и варибельности формы спектров возбуждения флуоресценции фотосенсибилизатора с традиционными методами гель-хроматографии и ультрацентрифугирования. Показана возможность использования оптических характеристик фотосенсибилизатора для анализа как равновесных, так и кинетических процессов распределения фотосенсибилизатора в крови. Определены основные преимущества и ограничения применения рассмотренных методов в экспериментах *in vitro*.

Ключевые слова: темопорфин, β -циклодекстрины, комплексы включения, сыворотка крови, поляризация флуоресценции, круговой дихроизм, полоса Соре.

*Different optical methods for the analysis of the process of temoporfin photosensitizer distribution between supramolecular nanosized inclusion complexes based on β -cyclodextrins and blood serum proteins were considered. We compared the application possibilities of the methods based on induced circular dichroism, fluorescence anisotropy, and variability of the fluorescence excitation spectra shape of the photosensitizer with such traditional methods as gel-chromatography and ultracentrifugation. The possibility of using the photosensitizer optical characteristics for the analysis of both equilibrium and kinetic processes of photosensitizer distribution in blood was shown. The main advantages and limitations of the studied approaches in *in vitro* experiments were described.*

Keywords: temoporfin, β -cyclodextrins, inclusion complexes, blood serum, fluorescence anisotropy, circular dichroism, Soret band.

OPTICAL METHODS FOR THE ANALYSIS OF THE TEMOPORFIN PHOTSENSIBILIZER DISTRIBUTION BETWEEN SERUM PROTEINS AND METHYL- β -CYCLODEXTRIN NANOCARRIERS IN THE BLOOD SERUM

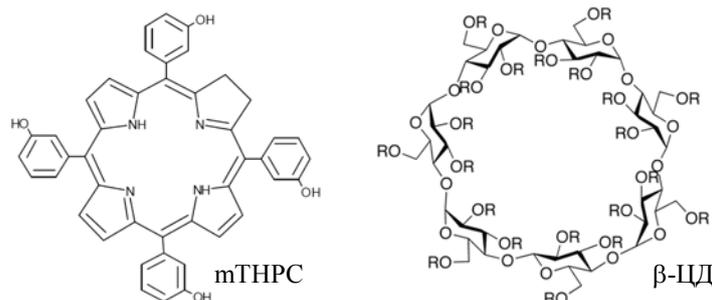
I. V. Yakavets^{1,2,3}, I. V. Yankovsky¹, I. I. Khludeyev^{1,4}, Н.-П. Lassalle^{2,3}, L. N. Bezdetnaya^{2,3},
V. P. Zorin^{1,5*} (¹ Belarusian State University, 4 Nezavisimosti Prosp., Minsk, 220030, Belarus; e-mail: vpzorin@mail.ru; ² Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7039, Université de Lorraine, Campus Sciences, Vandœuvre-lès-Nancy, France; ³ Institut de Cancérologie de Lorraine, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy, France; ⁴ Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics, Minsk, Belarus; ⁵ A. D. Sakharov International State Environmental Institute of the Belarusian State University, Minsk, Belarus)

Введение. Механизмы транспорта фотосенсибилизаторов (ФС) в крови играют ключевую роль при контроле процессов их распределения в организме. Хорошо известно, что после внутривенного введения большинство порфириновых ФС равновесно связываются с различными транспортными белками сыворотки крови [1, 2]. Природа белков переносчиков ФС в крови оказывает значительное влияние на особенности их фармакокинетики. Показано, что связывание ФС с липопротеинами сыворотки крови обуславливает более высокую скорость выведения ФС из организма по сравнению с транспортом в составе сывороточного альбумина (СА) [3]. Участие различных белков-переносчиков является одним из ключевых факторов, определяющих механизм накопления ФС в патологической ткани. Считается, что перенос молекул ФС в комплексах с СА увеличивает эффективность повреждения при фотодинамическом воздействии васкулярной системы и стромы опухоли, в то время как транспорт ФС в составе липопротеинов низкой плотности (ЛНП) и липопротеинов высокой плотности (ЛВП) способствует доставке ФС непосредственно в опухолевые клетки [2].

Интерес к изучению процессов распределения ФС в крови в настоящее время усиливается в связи с применением новых наноразмерных фармакологических форм и систем лекарственной доставки (дендримеров, мицеллярных структур, липосомальных носителей, полимерных наночастиц и др.) [4]. Введение ФС в состав подобных структур может оказывать значительное влияние как на процессы взаимодействия его с транспортными белками сыворотки крови, так и на фармакокинетику ФС в целом. Так, в случае внутривенного введения липосомальных форм ФС может происходить частичное разрушение наноносителей при взаимодействии с белками сыворотки, тогда как стерическая стабилизация липидных везикул молекулами полиэтиленгликоля увеличивает время полувыведения ФС из крови в несколько раз [5].

Одной из перспективных лекарственных форм для введения неполярных ФС являются супрамолекулярные комплексы включения ФС с циклодекстринами. В настоящее время широко применяются комплексы включения на основе циклических олигосахаридов — β -циклодекстринов (β -ЦД) [6]. Уникальная торообразная структура молекул β -ЦД позволяет им эффективно образовывать нековалентные комплексы включения по механизму гость—хозяин со многими лекарственными средствами [7], в том числе порфириновыми ФС [8—10].

Мета-тетра(3-гидроксифенил)хлорин (темопорфин, mTHPC) — один из наиболее эффективных порфириновых ФС второго поколения, одобренный в 2001 г. к клиническому использованию в Евросоюзе для паллиативного лечения рака головы и шеи [11, 12]. Данное соединение агрегирует в водных растворах, что значительно затрудняет введение препарата в организм. В связи с этим предложено использовать для доставки mTHPC наноразмерные системы, в том числе комплексы включения на основе производных β -ЦД [13—15]:



Показано, что производные β -ЦД с высокой эффективностью образуют комплексы включения с mTHPC [9, 16] и оказывают значительное влияние на процессы распределения mTHPC как в модельных клеточных системах [15], так и в организме животных-опухоленосителей *in vivo* [13]. Следует отметить, что процессы альтерации биораспределения mTHPC в значительной степени зависят от типа производного β -ЦД и уровня его концентрации в биологических системах [13, 15]. В связи с этим применение систем введения с использованием производных β -ЦД предполагает разработку методов контроля процессов комплексообразования молекул ФС с β -ЦД в различных биологических системах, в том числе в крови.

В данной работе показана возможность применения различных методов для осуществления контроля процессов распределения mTHPC в сыворотке крови при использовании комплексов включения с метил- β -циклодекстрином (М- β -ЦД) в качестве наноразмерной системы лекарственной достав-

ки мТНРС. Согласно полученным ранее данным [13, 15], использование М-β-ЦД приводит как к более эффективному накоплению мТНРС в опухолевой ткани *in vivo*, так и к увеличению эффективности фотодинамического повреждения опухолевых сфероидов *in vitro* по сравнению с другими производными β-ЦД. Для регистрации процессов распределения молекул ФС между белками сыворотки и М-β-ЦД применяются оптические методы, основанные на различиях оптической активности и спектрально-флуоресцентных характеристик мТНРС в составе комплексов включения с М-β-ЦД и при связывании с белками сыворотки. Сравниваются результаты, полученные оптическими методами и методом эксклюзионной гель-хроматографии.

Материалы и методы. мТНРС предоставлен компанией Biolitec Research GmbH (Германия). Использована эмбриональная сыворотка телят производства Sigma Aldrich (США), а также М-β-ЦД производства AgaChem (Нидерланды). Содержание основного вещества в реагентах ≥99 %.

Фотометрические и флуоресцентные измерения. Характеристики флуоресценции мТНРС измерены с использованием спектрофлуориметра Solar CM-2203 (“Солар”, Беларусь), оборудованного термостатируемой ячейкой с магнитной мешалкой, спектры индуцированного кругового дихроизма — с помощью спектрометра Chirascan V100 (Applied Photophysics Limited, Англия), оснащенного термостатируемой ячейкой с магнитной мешалкой.

Для измерения количества ФС, связанного с молекулами М-β-ЦД в сыворотке крови, использован спектральный метод, в основе которого лежит анализ изменений полосы Core мТНРС, описанный в [14]. Флуоресценция мТНРС возбуждалась на λ = 407 и 422 нм и регистрировалась на λ = 652 нм. При измерении степени поляризации флуоресценции мТНРС использован возбуждающий свет с λ = 435 нм [13, 17]. Оптическая плотность всех образцов на длинах волн возбуждения и регистрации флуоресценции ≤0.3.

Эксклюзионная гель-хроматография. мТНРС (1.5 мкМ) предварительно инкубировали в водных растворах 2 %-ной сыворотки с различными концентрациями М-β-ЦД в течение 2 ч при температуре 37 °С в темноте. Методика разделения и биохимический анализ белковых фракций соответствуют описанным ранее [13, 18], за исключением использования хроматографической колонки 1.5×35 см (Sigma, США), заполненной гелем Sephadex G-200 (GE Healthcare, США). Концентрация мТНРС в хроматографических фракциях определена путем измерения интенсивности флуоресценции ФС после добавления к образцу 0.2 % нейтрального детергента Triton® X-100. Интенсивности флуоресценции скорректированы с учетом объема фракции и раствора детергента.

Результаты и их обсуждение. Гель-хроматография. Для анализа сродства лекарственных соединений к белкам сыворотки традиционно используются методы, основанные на разделении сыворотки на отдельные белковые фракции в соответствии с их плавучей плотностью (ультрацентрифугирование) или с размером/массой (эксклюзионная гель-хроматография) с последующим определением относительного содержания препарата в этих фракциях.

На рис. 1 представлены результаты гель-хроматографического разделения сыворотки крови. Как показывает использование техники биохимических маркеров, в первую очередь из колонки выходят самые крупные транспортные белки — ЛНП (объем исключения 20—27 мл). Во фракциях второй полосы хроматограммы с объемами исключения от 27 до 35 мл находятся ЛВП и макроглобулины. В последнюю очередь из хроматографической колонки выходят СА и иммуноглобулины (третья полоса, объем исключения 35—45 мл) [18].

При пропускании через хроматографическую колонку образца сыворотки, окрашенного мТНРС, на основании анализа концентрации мТНРС во фракциях элюента можно количественно определить равновесное распределение ФС между белковыми компонентами (рис. 1). Равновесное распределение мТНРС между белками сыворотки достигается спустя несколько часов инкубации раствора сыворотки при 37 °С, в течение которых осуществляется полная мономеризация мТНРС [18]. Результаты свидетельствуют о том, что в растворе сыворотки ~65 % ФС связывается с ЛВП, 35 % — с ЛНП. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными ранее методом ультрацентрифугирования [13, 18].

В присутствии М-β-ЦД наблюдается быстрое (30—40 мин) достижение равновесного распределения мТНРС в сыворотке крови за счет устранения процессов агрегации ФС (данные не приведены). Проанализируем влияние концентрации М-β-ЦД на процессы распределения мТНРС между основными транспортными белками сыворотки крови. Увеличение концентрации М-β-ЦД приводит к смещению равновесного распределения мТНРС в сторону комплексов включения с М-β-ЦД и появ-

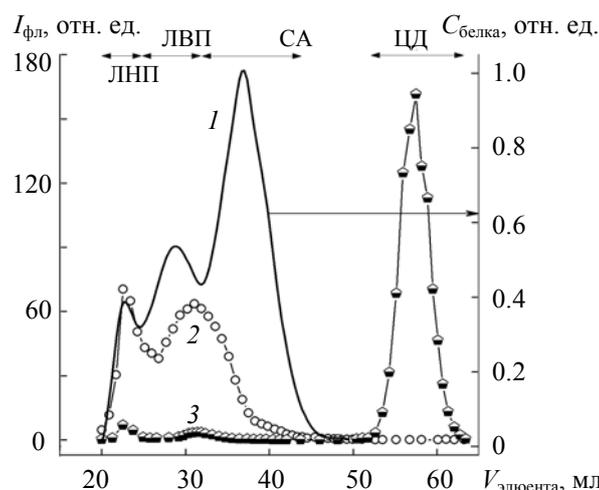


Рис. 1. Хроматограмма белков сыворотки крови (1) и профили элюции mTНРС (1.5 мкМ) в 2 %-ном растворе сыворотки без M-β-ЦД (2) и с добавлением 200 мкМ M-β-ЦД (3)

лению фракции ФС, не связанного с белками сыворотки. Об этом свидетельствует появление нового пика на хроматограмме (объем исключения 50—70 мл). Комплексы включения выходят из хроматографической колонки после всех белков сыворотки крови, поскольку имеют меньшие (~3 нм [19]) размеры по сравнению с сывороточными белками. В табл. 1 представлены результаты анализа относительных весов хроматографических пиков. Увеличение концентрации M-β-ЦД сопровождается ростом относительного веса фракции mTНРС в составе комплексов включения, в то время как при увеличении концентрации сыворотки наблюдается обратный эффект [13]. Сравнительный анализ относительных весов хроматографических пиков показывает, что присутствие M-β-ЦД не оказывает влияния на распределение mTНРС между основными транспортными сывороточными белками (соотношение 1:2 между ЛНП и ЛВП сохраняется для всех концентраций M-β-ЦД).

Т а б л и ц а 1. Распределение mTНРС между белковыми фракциями сыворотки крови в присутствии различных концентраций M-β-ЦД

Концентрация M-β-ЦД, мкМ	ЛНП	ЛВП	M-β-ЦД
0	0.35	0.65	—
5	0.25	0.57	0.18
10	0.17	0.38	0.45
20	0.10	0.21	0.69
200	0.01	0.02	0.97

П р и м е ч а н и е. Представлены относительные веса различных пиков в хроматограмме, полученные путем аппроксимации гауссовыми кривыми в пакете Origin 7.0; средняя ошибка измерений ≤ 0.03 .

Круговой дихроизм. Описанный метод гель-хроматографии, как и техника ультрацентрифугирования, позволяет получать информацию только о равновесных характеристиках распределения ФС в сыворотке крови. Анализ кинетических характеристик требует использования экспериментальных методов, основанных на анализе процессов комплексообразования ФС *in situ*. В связи с этим могут быть использованы методические подходы, основанные на различиях спектрально-флуоресцентных свойств и характеристик оптической активности ФС, связанного с сывороточными белками, и ФС в составе комплексов включения с β-ЦД.

Образование комплексов включения между оптически не активной молекулой mTНРС и хиральными молекулами β-ЦД может приводить к появлению индуцированного кругового дихроизма (эффект Коттона), обусловленного взаимодействием электронных орбиталей ФС с внутренней полостью β-ЦД [8, 20]. На рис. 2 представлены спектры электронного поглощения и кругового дихроизма (КД) mTНРС в растворе с M-β-ЦД и в растворе сыворотки. Согласно полученным данным, для молекул

mТНРС, связанных с белками сыворотки крови, эффект Коттона практически полностью отсутствует. Образование комплексов включения mТНРС с М-β-ЦД приводит к появлению значительного индуцированного КД в участках спектра, соответствующих наиболее интенсивным полосам поглощения mТНРС. Положительный эффект Коттона наблюдается для коротковолнового плеча полосы Core mТНРС (B_y), а также для полосы Q_2 спектра поглощения mТНРС, а отрицательный эффект Коттона обнаружен для второй компоненты полосы Core (B_x) и полос Q_1 и Q_4 . Следует отметить, что величина и знак эффекта Коттона при образовании комплексов включения зависят от углов между осью симметрии β-ЦД и диполем электронных переходов молекулы mТНРС и обусловлены стерической структурой комплекса включения [8].

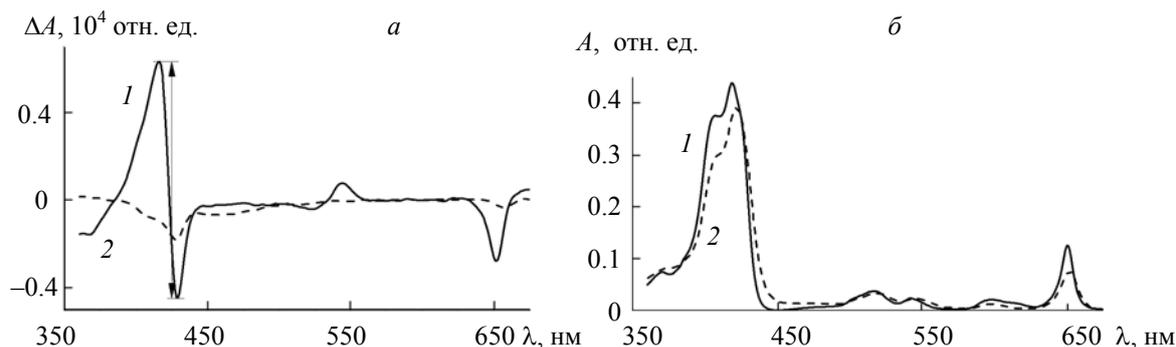


Рис. 2. Спектры индуцированного КД (а) и электронного поглощения (б) mТНРС в растворе с М-β-ЦД (1) и в растворе сыворотки крови (2); концентрация mТНРС 3 мкМ, концентрация М-β-ЦД 200 мкМ, концентрация сыворотки 2 %

Наличие эффекта Коттона непосредственно связано с образованием комплексов mТНРС/М-β-ЦД, поэтому изменение величины индуцированного КД позволяет контролировать распределение mТНРС между М-β-ЦД и белками сыворотки крови. На основании измерения амплитуды индуцированного КД можно судить как о равновесных процессах распределения, так и о кинетике перераспределения молекул ФС между белками сыворотки и комплексами включения с М-β-ЦД. Следует отметить, что при использовании данного методического подхода концентрация mТНРС должна превышать 1 мкМ. Кроме того, необходимо учитывать существенное влияние мутности и рассеивающей способности образцов на регистрируемый сигнал, что в свою очередь ведет к ограничениям концентрации сыворотки в исследуемых образцах.

Анизотропия флуоресценции. Ранее было показано [13, 14], что поляризации флуоресценции mТНРС в составе комплексов включения с β-ЦД и при связывании с белками сыворотки крови сильно различаются. Жесткая фиксация молекул mТНРС при связывании с относительно большими ЛНП (23—26 нм) и ЛВП (8—13 нм [21]) существенно ограничивает скорость вращательной релаксации ФС, вследствие чего степень поляризации флуоресценции (P) mТНРС в растворе сыворотки крови достигает 28—30 %. Связывание относительно небольших молекул β-ЦД с mТНРС лишь незначительно увеличивает массу и гидродинамический радиус молекулы ФС (2—3 нм [19]), что отражается в низкой степени поляризации флуоресценции mТНРС в растворе М-β-ЦД (4—5 %).

На рис. 3 представлены типичные кинетики изменения степени поляризации флуоресценции mТНРС при добавлении комплексов включения с М-β-ЦД в 2 %-ный раствор сыворотки крови. Изменение степени поляризации флуоресценции свидетельствует о достаточно быстром перераспределении молекул ФС из состава комплексов включения на белки сыворотки крови. Анализ степени поляризации флуоресценции mТНРС в образцах, проинкубированных в течение >30 мин, позволяет получить информацию о равновесном распределении ФС между белками сыворотки и М-β-ЦД. Количество ФС, перераспредевшегося на белки сыворотки, зависит от концентрации М-β-ЦД.

Таким образом, значительные различия степени поляризации флуоресценции mТНРС, связанного с белками сыворотки, и mТНРС в составе комплексов включения позволяют использовать данный параметр для контроля за процессами распределения молекул ФС в крови при концентрациях >50 нМ. Следует отметить, что анизотропия флуоресценции чувствительна к изменению мутности образцов, а также к ряду эффектов, связанных с изменением локальной концентрации флуорофоров. Все это накладывает определенные ограничения на концентрации как ФС, так и сывороточных белков.

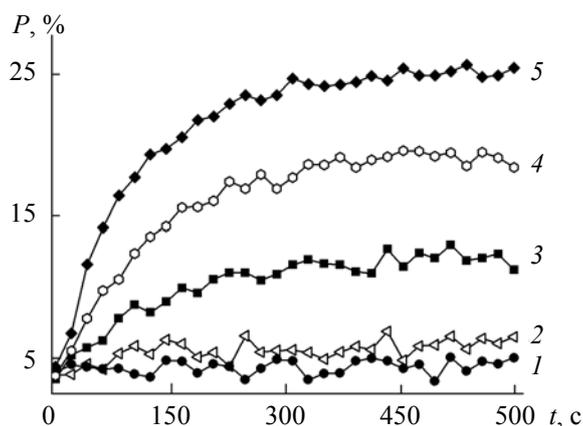


Рис. 3. Кинетики перераспределения мТНРС из состава комплексов с М-β-ЦД на транспортные белки сыворотки; концентрация мТНРС 0.5 мкМ, концентрация М-β-ЦД: 5 (1), 10 (2), 20 (3), 50 (4) и 200 мкМ (5), концентрация сыворотки 2 %

Спектральный метод на основе анализа формы полосы Core мТНРС. В качестве альтернативного методического подхода нами использован анализ изменений формы полос спектра возбуждения мТНРС при связывании с различными биологическими структурами [14]. В основе данной методики предположение, что связывание молекулы ФС с β-ЦД либо с белками сыворотки приводит к изменению конформации молекулы мТНРС, вследствие чего изменяются относительные веса полос, входящих в состав полосы Core мТНРС [14]. Для количественного описания изменений формы полосы Core предложено использовать отношение интенсивностей флуоресценции мТНРС при возбуждении в различных участках полосы Core (407 и 422 нм). Так, например, в случае связывания мТНРС с молекулами М-β-ЦД $I_{407}/I_{422} = 0.63$. Отношение I_{407}/I_{422} , полученное при анализе спектров возбуждения флуоресценции мТНРС в составе белков сыворотки крови, равно 0.41.

На рис. 4 представлены результаты сравнительного анализа данных, полученных различными спектрально-флуоресцентными методами в ходе исследования равновесного распределения мТНРС в 2 %-ном растворе сыворотки в присутствии различных концентраций М-β-ЦД. Показано, что добавление низких концентраций М-β-ЦД (<5 мкМ) практически не оказывает влияния на равновесное распределение мТНРС между белками сыворотки и М-β-ЦД. Об этом свидетельствуют максимальная степень поляризации флуоресценции мТНРС ($P = 25\%$), а также минимальное отношение I_{407}/I_{422} (0.41). При увеличении концентрации М-β-ЦД наблюдается перераспределение молекул ФС из белков сыворотки в комплексы включения. Равновесное распределение мТНРС смещается в сторону образования комплексов с М-β-ЦД, что сопровождается изменением степени поляризации флуоресценции и параметра I_{407}/I_{422} . В случае высоких концентраций М-β-ЦД (>500 мкМ) молекулы мТНРС полностью связываются с М-β-ЦД (P достигает 4–5 %, $I_{407}/I_{422} = 0.63$, эти значения не изменяются с увеличением концентрации М-β-ЦД).

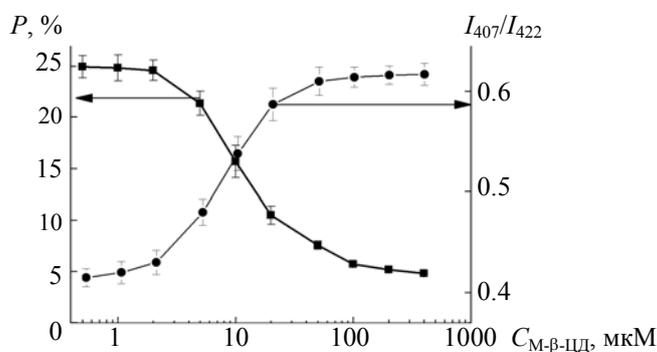


Рис. 4. Зависимость степени поляризации флуоресценции (P) и параметра I_{407}/I_{422} мТНРС в сыворотке крови от концентрации М-β-ЦД в растворе; концентрация мТНРС 0.5 мкМ, концентрация сыворотки 2 %

Применение методического подхода на основе вариабельности формы полосы Core мТНРС для регистрации процессов распределения ФС между комплексами включения с М-β-ЦД и сывороточными белками дает результаты, аналогичные полученным при регистрации анизотропии флуоресценции мТНРС. Данная техника не подвержена влиянию концентрационных факторов, а также слабо зависит от рассеивающих свойств образцов, что делает ее наиболее универсальной из описанных выше методик. Следует отметить, что необходимым условием для эффективного использования данного метода являются достаточно высокие константы связывания ФС с молекулами β-ЦД ($>10^4 \text{ M}^{-1}$). В случае меньшего сродства β-ЦД к молекулам ФС наиболее объективен методический подход, основанный на регистрации оптической активности мТНРС при связывании с β-ЦД.

Заключение. Полученные результаты демонстрируют возможности оптических методов для анализа процессов распределения фотосенсибилизатора между наноразмерными системами введения на основе β-ЦД и транспортными белками сыворотки крови. Рассмотренные методические подходы обладают высокой чувствительностью и позволяют с высокой точностью регистрировать кинетические и равновесные процессы распределения фотосенсибилизатора в сыворотке крови и твердых тканях. Методические подходы, основанные на анализе изменений индуцированного кругового дихроизма и поляризации флуоресценции, могут с успехом применяться в случае, если концентрация фотосенсибилизатора $>1 \text{ мкМ}$. Результаты, полученные с использованием данных методов, подвержены влиянию мутности и рассеивающей способности среды, а также могут зависеть от типа β-ЦД и локальной концентрации фотосенсибилизатора. В то же время спектрально-флуоресцентная методика, основанная на анализе изменения формы полосы Core спектра возбуждения мТНРС, более универсальна и позволяет с высокой точностью детектировать сайты связывания мТНРС в сложных гетерогенных системах в пределах чувствительности флуоресцентного метода анализа. Предполагается использование разработанных методов для анализа структурных характеристик сложных гибридных структур на основе биологических мембран и β-ЦД (drug-in-cyclodextrin-in-liposome [22]), а также для отработки протоколов применения комплексов включения мТНРС с β-ЦД в фотодинамической терапии.

Авторы выражают благодарность А. Крижнику за помощь в измерениях характеристик кругового дихроизма фотосенсибилизатора.

Работа выполнена при частичной поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (гранты № М16М-049 и № М17МС-028), Института канцерологии Лотарингии (Нанси, Франция) и Французской национальной лиги по борьбе с раком (CCIR-GE).

- [1] J. P. Reyftmann, P. Morliere, S. Goldstein, R. Santus, L. Dubertret, D. Lagrange. *Photochem. Photobiol.*, **40** (1984) 721—730
- [2] G. Jori, E. Reddi. *Int. J. Biochem.*, **25** (1993) 1369—1375
- [3] E. Reddi. *J. Photochem. Photobiol. B*, **37** (1997) 189—195
- [4] T. G. St Denis, M. R. Hamblin. *Appl. Nanosci. Photomed.*, Chandos Publ., Oxford (2015) 465—485
- [5] V. Reshetov, V. Zorin, A. Siupa, M.-A. D'Hallewin, F. Guillemin, L. Bezdetnaya. *Photochem. Photobiol.*, **88** (2012) 1256—1264
- [6] S. V. Kurkov, T. Loftsson. *Int. J. Pharm.*, **453** (2013) 167—180
- [7] D. Duchêne. In: “Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications”, Ed. E. Bilensoy, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA (2011) 1—18
- [8] S. Hamai, T. Ohshida. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **50** (2004) 209—217
- [9] D. Demore, A. Kasselouri, O. Bourdon, J. Blais, G. Mahuzier, P. Prognon. *Appl. Spectrosc.*, **53** (1999) 523—527
- [10] H. Kolárová, M. Huf, J. Macedek, P. Nevrelová, M. Tomecka, R. Bajgar, J. Mosinger, M. Strnad. *Acta Medica Hradec Král. Univ. Carol. Fac. Medica Hradec Král.*, **47** (2004) 313—315
- [11] M. O. Senge, J. C. Brandt. *Photochem. Photobiol.*, **87** (2011) 1240—1296
- [12] M. O. Senge. *Photodiagn. Photodyn. Therapy*, **9** (2012) 170—179
- [13] I. Yankovsky, E. Bastien, I. Yakavets, I. Khludayev, H.-P. Lassalle, S. Gräfe, L. Bezdetnaya, V. Zorin. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*, **91** (2016) 172—182
- [14] I. Yakavets, I. Yankovsky, L. Bezdetnaya, V. Zorin. *Dyes Pigments*, **137** (2017) 299—306
- [15] I. Yakavets, I. Yankovsky, M. Millard, L. Lamy, H.-P. Lassalle, A. Wiehe, V. Zorin, L. Bezdetnaya. *Int. J. Pharm.*, **529** (2017) 568—575

-
- [16] **A. Bautista-Sanchez, A. Kasselouri, M.-C. Desroches, J. Blais, P. Maillard, D. M. de Oliveira, A. C. Tedesco, P. Prognon, J. Delaire.** *J. Photochem. Photobiol. B*, **81** (2005) 154—162
- [17] **В. А. Решетов, Т. Е. Зорина, М.-А. Д'Аллеван, Л. Н. Болотина, В. П. Зорин.** *Журн. прикл. спектр.*, **78**, № 1 (2011) 114—120 [**V. A. Reshetov, T. E. Zorina, M.-A. D'Hallewin, L. N. Bolotina, V. P. Zorin.** *J. Appl. Spectr.*, **78** (2011) 103—109]
- [18] **S. Sasnouski, V. Zorin, I. Khludeyev, M.-A. D'Hallewin, F. Guillemin, L. Bezdetsnaya.** *Biochim. Biophys. Acta*, **1725** (2005) 394—402
- [19] **R. J. Glisoni, D. A. Chiappetta, A. G. Moglioni, A. Sosnik.** *Pharm. Res.*, **29** (2011) 739—755
- [20] **M. C. Desroches, A. Kasselouri, O. Bourdon, P. Chaminade, J. Blais, P. Prognon.** *Analyst*, **126** (2001) 923—927
- [21] **M. Dobiášová, Z. Urbanová, M. Samánek.** *Physiol. Res. Acad. Sci. Biohemoslov*, **54** (2005) 159—165
- [22] **J. Chen, W.-L. Lu, W. Gu, S.-S. Lu, Z.-P. Chen, B.-C. Cai, X.-X. Yang.** *Expert Opin. Drug Deliv.*, **11** (2014) 565—577